

Agnieszka Samochowiec<sup>1, 4</sup>, Agnieszka Mordasewicz<sup>2</sup>,  
Georg Arentowicz<sup>3</sup>, Jerzy Samochowiec<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Międzywydziałowe Studium Kształcenia Pedagogicznego, Uniwersytet Szczeciński w Szczecinie

<sup>2</sup>Centrum Psychiatryczne SPS ZOZ w Szczecinie

<sup>3</sup>AZIP Kolonia w Niemczach

<sup>4</sup>Katedra i Klinika Psychiatrii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie

## Wpływ badań genetycznych na poznanie patogenezy uzależnień

### *Addiction pathogenesis in genetic research*

#### Abstract

The familial occurrence of alcoholism has been known for many years. Approximately 50–60% of individual differences in risk for alcoholism is genetic, and this proportion is approximately equal in man and woman. The goal of this article is to review the current status in the search for “candidate genes” for alcohol dependence. There are three basic approaches to identifying important genes. First, one can target genes based on their presumed importance in influencing alcohol sensitivity. The targeted gene can be overexpressed, underexpressed, or disrupted to the extent that its function is ablated (a gene knock-out). Second, one can seek genes that are identified as important because they are differentially expressed. Third, one can seek variations in the sequence of genes that are associated with alcohol sensitivity. The first approach can only be attempted using genetic animal models. Each approach will be reviewed, with an emphasis on the second and third. The examples of statistical measures will be present, the differences between family designed studies and association studies in compare to unrelated healthy volunteers will be discussed.

**key words:** molecular-genetic investigations, alcohol dependence, alcohol withdrawal, association and linkage studies, „knock-out” technology, QTL, TDT

#### Wstęp

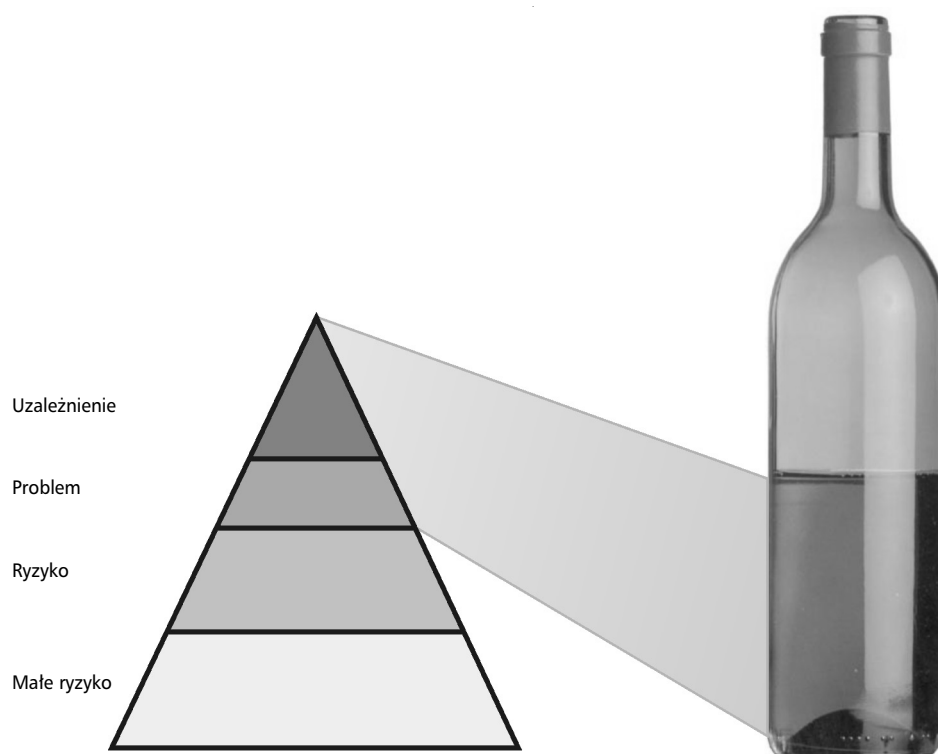
Wyniki badań nad alkoholizmem na przestrzeni lat określają ryzyko uzależnienia, towarzyszące spożywaniu alkoholu, z których 40–50% odnosi się do czynników środowiskowych, a 50–60% do czynników genetycznych [1]. Zależność między ilością spożywanego alkoholu a powstałymi z tego powodu problemami jest obszarem ciągłych poszukiwań naukowych, w tym również wpływu podłoża genetycznego, na patogenezę uzależnień. W każdym kraju na świecie średnia ilość alkoholu przypadająca na jednego obywatela

(a więc spożycie *per capita*) jest różna. Wspólnym pozostaje fakt, że osoby uzależnione i nadużywające alkoholu przyjmują ponad połowę ogólnej spożywanej ilości (ryc. 1).

Już „ojciec” alkoholologii Jellinek opisał 3 czynniki wpływające na rozwój uzależnienia: osobowość, środowisko, czynniki konstytucjonalne. W świetle tej teorii biologiczni krewni uzależnionego od alkoholu charakteryzują się wyższym ryzykiem uzależnienia, jakkolwiek to, co się dziedziczy, to allele genów kandydujących predysponujących do uzależnienia albo działających protekcyjnie [2].

Na pytania stawiane przez badaczy ciągle poszukuje się odpowiedzi, gdyż wpływ genów w chorobach i zaburzeniach psychicznych, takich jak na przykład alkoholizm, nie jest jednoznaczny. Wynika to z różnorodności sposobów dziedziczenia. Dziedziczenie jed-

Adres do korespondencji: prof. dr hab. med. Jerzy Samochowiec  
Katedra i Klinika Psychiatrii Pomorskiej Akademii Medycznej  
ul. Broniewskiego 26, 71–460 Szczecin  
e-mail: samoj@sci.pam.szczecin.pl  
tel./faks: (091) 454 15 07



**Rycina 1.** Zależność między spożywaniem alkoholu a powstałymi z tego powodu problemami  
**Figure 1.** The connection between alcohol consumption and the resultant problems

nogenowe wiąże się z istnieniem polimorfizmu tylko pojedynczego odpowiedzialnego genu, natomiast dziedziczenie wielogenowe charakteryzuje się występowaniem wielu polimorfizmów genów kandydujących i ich interakcją z wpływem czynników środowiskowych na ich ekspresję.

Uprozczone podejście genetyczne przyniosło sukces w rozpoznawaniu bądź zapobieganiu choroby Alzheimera, raka sutka, raka macicy; strategia ta nie przyniosła natomiast oczekiwanych rezultatów w poznaniu patogenezy schizofrenii, zaburzeń afektywnych i w alkoholizmie [3, 4]. Geny predysponujące do danego typu osobowości i zespołu zależności alkoholowej wzbudzają wielkie emocje z powodu braku 100-procentowego determinizmu, występującego tylko przy przekazywaniu następnemu pokoleniu tak zwanych chorób jednogenowych, jak na przykład w fenyloketonurii. Wpływ czynników genetycznych może być zarówno odwracalny, jak i nieodwracalny, podobnie jak czynników środowiskowych.

Istnieją doniesienia z badań, na podstawie których prawdopodobnie zostanie wkrótce określone podłoże genetyczne niektórych zaburzeń. Dotyczą one: alkoholizmu, autyzmu, chorób afektywnych, schizofrenii czy zaburzeń osobowości [5].

Określenie patogenezy uzależnień wiąże się z poznaniem strategii identyfikujących geny w chorobach uwarunkowanych wielogenowo.

#### **Badania genetyczne a poznanie patogenezy uzależnień**

Istnieje wiele danych potwierdzających tezę, że alkoholizm ma silne uwarunkowania rodzinne i genetyczne. Badania bliźniąt, adopcyjne oraz badania rodzin wykazują, że dziedziczenie ryzyka zapadalności na alkoholizm jest w 50–60% uwarunkowane genetycznie zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet [1, 6].

Mimo że fakt ten był znany od wielu lat, dopiero od ostatniej dekady naukowcy zaczęli używać zaawansowanych technik badawczych koniecznych do identyfikowania genów zaangażowanych w rozwój uzależnienia od alkoholu. Mimo uwzględnienia wielu różnych procesów behawioralnych nadal najważniejszą teorią pozostaje nagradzające i awersyjne działanie etanolu na procesy motywacyjne. Uważa się, że efekt wywołany przez etanol determinuje, czy osoba spożywająca alkohol będzie kontynuowała konsumpcję i zwiększała jego ilość. Uważa się, że genetycznie uwarunkowane różnice we wrażliwości na nagrodotwórcze i awersyjne działanie etanolu są jednym z naj-

ważniejszych czynników rozwoju modelu „picia ekscesywnego”, charakterystycznego dla nadużywania i zespołu zależności alkoholowej [7].

Celem poszukiwań genów odpowiedzialnych za choroby psychiczne jest opracowanie zindywidualizowanego modelu prewencji i terapii genowej. Istotna jest identyfikacja predysponującego genu, poznanie patofizjologii i diagnozy oraz odpowiedzi farmakogenetycznej.

### Badania asocjacyjne i badania łączone

W poszukiwaniu genów kandydujących wykorzystuje się badania asocjacyjne oparte na porównywaniu częstości występowania patologicznych alleli u niespokrewnionych osobników, u których rozpoznano kryteria choroby według ICD-10 w porównaniu z frekwencją tych samych alleli u niespokrewnionych osobników zdrowych (niemających diagnozy psychiatrycznej w ICD-10) [8].

Istotnie zwiększona frekwencja chorobotwórczego allelu w grupie chorych jest liczbą niemianowaną, określającą tak zwane relatywne ryzyko. Wskazuje, o ile wzrasta ryzyko wystąpienia danej choroby w przypadku posiadania tego specyficznego allelu chorobotwórczego (tab. 1).

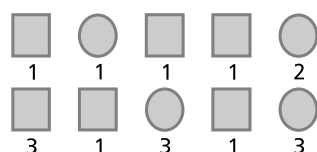
Badania asocjacyjne obejmujące populacje niespokrewnione nie dotyczą rodzinnego przebiegu dziedziczenia. Analizuje się w nich, czy choroba i allel występują w danej populacji istotnie częściej lub rzadziej (ryc. 2). Sytuacja wygląda inaczej, kiedy frekwencja mutacji jest mniejsza u chorych niż u zdrowych, wtedy allel czy też badany genotyp posiada właściwości ochronne. Przeprowadzone asocjacyjne badania rodzinne zajmują się przebiegiem uzależnienia, podobnie jak badania łączone, wykorzystując tak zwany test nierównowagi transmisji (TDT, *transmission-disequilibrium test*), dzięki któremu można określić, czy dziedziczenie (transmisja–przekazywanie) badanych alleli odbywa się zgodnie z prawem Hardy’ego-Weinberga (HWE). Jeśli prawo HWE nie jest spełnione, to jest możliwe, że zmieniona allela jest transmitowana znamiennie częściej od matki bądź ojca do dzieci — probandów. Wybiórcze posiadanie tych chorobotwórczych alleli powoduje obciążenie genetyczne u dzieci. Mimo braku czynnika środowiskowego czy osobowościowego biologiczne czynniki mogą przekroczyć ilościowo pewien próg normalności, a podatność na uzależnienie będzie wysoka i u pacjenta rozwinie się zespół zależności alkoholowej, na przykład allel A w badanym genie powiązany jest z „cechą”, jeśli pojawia się istot-

Tabela 1. Przykłady obliczeń asocjacyjnych dla biallelicznego polimorfizmu

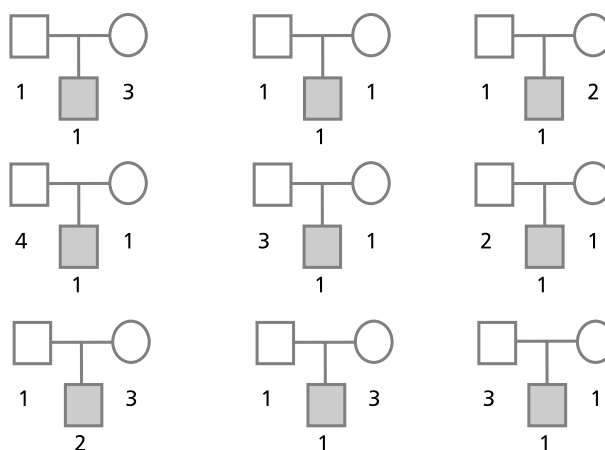
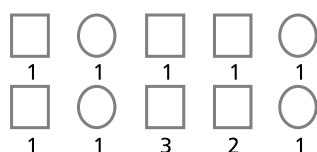
Table 2. The examples of associative calculations for biallelic polymorphism

	Allel 1	Allel 2	
Pacjent	a	b	Relatywne ryzyko = $(a \times d)/(c \times b)$
Grupa kontrolna	c	d	

### Grupa chorych osobników niespokrewnionych



### Grupa zdrowych osobników niespokrewnionych



Allele chorobowe 1/3 – Allele kontrolne 2/4

Rycina 2. Badania asocjacyjne u osób niespokrewnionych i u rodzin

Figure 2. Associative calculations among relatives and not related people

nie częściej wśród osób „dotkniętych” niż „niedotkniętych” chorobą. Analiza statystyczna jest prosta i posługuje się wyłącznie tabelą zgodności  $2 \times 2$ . Największą pułapką tych badań jest sposób doboru grupy kontrolnej, co odróżnia ją od analizy sprzężeń i metody wspólnych alleli, które badają specyficzny model losowego dziedziczenia mendelowskiego w rodzinie i nie wymagają wykorzystania grupy kontrolnej. Wprawdzie badania asocjacyjne mogą być przeprowadzone w wypadku każdego losowego polimorfizmu DNA, są jednak najbardziej skuteczne w wypadku odmian czynnościowych genów posiadających wyraźny związek biologiczny z badaną cechą.

Wystąpienie dodatniej asocjacji niewiele mówi o chorobie. Powodem jej wystąpienia może być sytuacja, w której asocjacja dodatnia wystąpi, gdy allel A jest przyczyną choroby; w tym wypadku taka asocjacja powinna wystąpić we wszystkich populacjach. Asocjacja dodatnia wystąpi również, gdy allel A nie jest odpowiedzialny za cechę, lecz znajduje się w nierównowadze łączonej z allelem sprawczym, czyli A występuje na chromosomach, które zawierają mutację chorobotwórczą. Nierównowaga łączona wystąpi w populacji, gdy spełnione są dwa warunki: większość przypadków danej cechy wynika ze stosunkowo niewielu mutacji w poprzednich pokoleniach w *locus* odpowiedzialnym za cechę oraz allel markerowy występował na jednym z tych chromosomów w poprzednich pokoleniach i znajduje się stosunkowo blisko *locus* odpowiedzialnego za cechę, tak że rekombinacje pokoleniowe nie oddzieliły ich. Nierównowaga łączona (z ang. *linkage disequilibrium*) występuje najczęściej w młodej izolowanej populacji ludzkiej (np. populacja fińska).

Rzeczywiste asocjacje spowodowane nierównowagą łączoną mogą prowadzić do sprzecznych wniosków. Ponieważ nierównowaga wiąże się z historią populacji, cecha może być powiązana z allelem A<sub>1</sub> w jednej populacji, allelem A<sub>2</sub> w drugiej, natomiast w ogólnej populacji może nie wykazać żadnej asocjacji.

Co najbardziej niepokojące, dodatnie asocjacje mogą być artefaktem obliczeń statystycznych w danej populacji. W populacji mieszanej każda cecha występująca z większą częstością w grupie etnicznej wykazuje asocjację z każdym allelem, który występuje w tej grupie z większą częstotliwością. Wyobraźmy sobie, że młody genetyk bada cechę zdolności jedzenia pałeczkami w populacji chińskiej i w populacji San Francisco, uwzględniając asocjację z kompleksem antygenów zgodności tkankowej (HLA). Okaze się, że allel HLA A<sub>1</sub> jest dodatnio powiązany ze zdolnością do jedzenia pałeczkami, nie dlatego, że czynniki immunologiczne

mają jakikolwiek wpływ na kulturę jedzenia, lecz dlatego że allel HLA A<sub>1</sub> występuje częściej u Azjatów niż u osób rasy białej.

Problem ten dotyczył wielu badań asocjacyjnych w populacjach niehomogennych, zaczynając od populacji Los Angeles, kończąc na szczepach Indian Północnoamerykańskich. Ciekawym przykładem było stwierdzenie, że Indianie szczepu Pima są bardziej podatni na cukrzycę typu 2 niż osoby rasy białej.

W celu uniknięcia owego artefaktu w populacji należy przeprowadzić badania asocjacyjne obejmujące stosunkowo homogenne populacje. Jeśli asocjacja występuje tylko w dużej, mieszanej populacji, a nie występuje w grupach homogennych, należy podejrzewać obecność artefaktu. Mając na uwadze trudności w doborze grupy kontrolnej, idealnie odpowiadającej pochodzeniu etnicznemu grupie badanej, badania asocjacyjne powinny uwzględnić „kontrolę wewnętrzną” częstości alleli: badanie osób dotkniętych i ich rodziców. Jeśli rodzice mają genotyp A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub> i A<sub>3</sub>/A<sub>4</sub>, natomiast osoba chora ma genotyp A<sub>1</sub>/A<sub>3</sub>, wówczas genotyp A<sub>2</sub>/A<sub>4</sub> (zawierający oba allele, których osoba chora nie odziedziczyła) będzie „sztuczną kontrolą”, dobrze dopasowaną co do pochodzenia etnicznego. Metodę tę nazywa się niekiedy rodzinną kontrolą cechy lub haplotypową metodą względnego ryzyka. Może ona być stosowana zarówno w odniesieniu do genotypów, jak i do alleli. Jej stosowanie powinno być rutyną. Pobranie DNA od rodziców jest istotne również z innego powodu. Znając genotyp rodziców, można konstruować haplotypy wielomarkerowe. Po ustaleniu asocjacji należy ją poddać próbie transmisji nierównowagi (TDT, *transmission-disequilibrium test*). W próbie tej zakłada się, że rodzic heterozygotyczny względem allelu asocjacyjnego A<sub>1</sub> i allelu nieasocjacyjnego A<sub>2</sub> powinien częściej przekazywać dziecku dotkniętemu allel A<sub>1</sub> niż A<sub>2</sub>. Test nierównowagi transmisji zastosowano po raz pierwszy w zagadkowym odkryciu, w którym gen dla insuliny wykazywał silną asocjację, lecz brak połączenia z cukrzycą typu 1. Połączenie to było niejasne z powodu znacznej ilości rodziców homozygotycznych, a przez to nieinformatywnych. Należy zauważyć, iż próby TDT nie można zastosować bezpośrednio do próbki, w której stwierdzono asocjację (ponieważ osoby dotknięte mają z konieczności nadmiar allelu asocjacyjnego), lecz do nowej próbki z tej samej populacji [2, 9, 10].

Podczas gdy badania asocjacyjne sprawdzają, czy choroba i allel występują razem w populacji, analiza sprzężeń (*linkage analysis*) wskazuje, czy cechy przekazywane są razem następnemu pokoleniu [4].

Analiza łączona uwzględnia określony model, tłumaczący przebieg dziedziczenia fenotypów i genotypów. Jest to metoda z wyboru w wypadku dziedziczenia według prostych cech mendlowskich. Analizę łączoną często wykorzystuje się do mapowania genetycznego u człowieka i stosuje się ją w setkach przypadków prostych cech jednogenowych. Zastosowanie tej metody do cech złożonych okazuje się zawodne z powodu trudności w precyzyjnym opisanie modelu tłumaczącego przebieg dziedziczenia.

Parametryczna analiza łączona (zależna od modelu dziedziczenia) stanowi logarytm prawdopodobieństwa (LOD) zaobserwowania rozkładu markerów i choroby wobec z góry założonego modelu dziedziczenia.

W przypadku chorób dziedziczonych w prosty sposób mendlowski wynik LOD równy lub większy od 3,0 w odniesieniu do całego genomu odpowiada statystycznie istotnemu łączeniu ( $p < 0,05$ ). Ponieważ nie udowodniono, że choroby psychiczne są spowodowane pojedynczym genem, należy opracować odpowiedni model dziedziczenia. Ponadto allele chorobotwórcze mogą występować bardzo często, wykazując niewielką penetrację, co może zaburzyć tradycyjną analizę sprzężeń, ponieważ ten sam gen może być przekazywany przez kilku przodków lub przez małżonków wchodzących do rodziny. Taka statystyka znacznie utrudnia analizę metodami parametrycznymi [2].

### **Badania identyfikujące geny kandydujące**

Główne podejścia w badaniach, które identyfikują geny kandydujące, skupiają się na poszukiwaniu genów wpływających na wrażliwość alkoholową. Ekspresja takiego genu może być nadmierna, osłabiona lub zahamowana (zwierzęta doświadczalne *knock-out* — KO). Badania dotyczą różnic ekspresji genów oraz poszukiwania wariantów sekwencji genów powiązanych z alkoholizmem, tak zwanych *quantitative trait loci* (QTL).

Ponieważ alkohol jak każda substancja psychoaktywna powoduje szerokie spektrum efektów behawioralnych, miejsca genetycznej wrażliwości są rozłożone liniowo. Mimo to typowe jest spektrum odpowiedzi dla środków uzależniających, to znaczy początkowa wrażliwość na substancję w organizmie dotychczas nienarażonym na jej działanie, pojawienie się zjawiska tolerancji, wystąpienie objawów abstynencyjnych oraz pojawienie się wzmacniających właściwości środka, złożonych z zachowania typowego dla poszukiwania środka narkotycznego (*drug seeking behaviour*) i w modelu samopodawania [11].

### **Technologia *knock-out***

W piśmiennictwie powszechnie omawia się technologie transgeniczne zmieniające specyficzne funkcje genowe na zwierzętach laboratoryjnych [11].

Badane są geny kodujące receptory neurotransmiterów, kinazy białkowej, geny kodujące enzymy.

Wszystkie badania nagrodotwórczego działania alkoholu opierają się na paradygmacie wzmocnienia opartym na teście wyboru dwóch butelek, porównując zwierzęta *knock-out* i zwierzęta z grupy kontrolnej (*wild type* — dzikie). Dobrym przykładem są badania koordynacji ruchowej po alkoholu. Zwierzęta pozbawione receptora 5HT<sub>1B</sub> są mniej wrażliwe na intoksykację alkoholową niż „dzikie” [12].

Innym przykładem jest opisany przez Homanicsa i wsp. brak wpływu *knock-out* podjednostki  $\alpha 6$  genu GABA A receptora na zespół abstynencyjny [13]. Coste i wsp. nie wykazali efektu *knock-out* genu dla receptora kortykotropinowego 2 na poziom reakcji lękowej u zwierząt [14].

Od kiedy z wielką precyzją można ocenić w mózgu zmieniony produkt genowy, technologia *knock-out* dostarcza wielu informacji dotyczących genetyki wrażliwości alkoholowej.

Przeprowadzono wiele badań nad zwierzętami doświadczalnymi typu *knock-out* (KO). Jedna grupa badań dotyczy KO w obrębie genów receptorów serotonergicznym (5HT).

Bouwknicht i wsp. obserwowali zachowania zwierząt po usunięciu genu 5-HT<sub>1B</sub>. Nie wykazali różnicy z grupą kontrolną, kiedy zwierzęta miały stały dostęp do etanolu [15].

W analogicznych badaniach, które przeprowadzili Crabbe i wsp., myszy „KO” piły więcej etanolu niż grupa kontrolna [16, 17].

Risinger i wsp. w swoich badaniach zastosowali dozownik do samoobsługi (dźwignia). Myszy „KO” początkowo wykazały większą wrażliwość na etanol, lecz efekt ten zanikał [18].

W badaniach, które przeprowadzili Engel i wsp. nad genem 5-HT<sub>3</sub> i w których myszy „KO” i z grupy kontrolnej miały stały dostęp do etanolu, myszy „KO” piły go mniej [19].

W wypadku podobnych metodologicznych eksperymentach Popova i wsp. badali „KO” genu MAO-A, nie stwierdzając znamiennych różnic z kontrolą [20].

Inna grupa doniesień dotyczy badań nad receptorami dopaminergicznymi.

Cunningham i wsp. badali gen receptora D<sub>2</sub>, warunkowali zwierzęta miejscem podawania alkoholu; znosili preferencje zwierząt do przebywania w tym miejscu [21].

W badaniach El-Ghundi i wsp. nad genem receptora D1 myszy „KO” piły istotnie mniej etanolu, mając do niego stały dostęp [22].

Phillips i wsp., badając gen  $D_2$ , otrzymali wyniki wskazujące na to, iż przy stałym dostępie do etanolu myszy „KO” piły go znacząco mniej [23].

Risinger i wsp., używając strategii samopodawania (dżwignia), w badaniach genu receptora D2 obserwowali, że myszy „KO” piły mniej etanolu. W analogiczny sposób badając białko DARPP-32, otrzymali wyniki, w których odpowiedź na etanol u mysz „KO” była obniżona [24].

Badania, które przeprowadzili Weinshenker i wsp., dotyczące *knock-out* genu  $\beta$ -hydroksylazy dopaminy wykazały, że przy stałym dostępie myszy „KO” piły mniej etanolu, jak również charakteryzowały się niską tolerancją etanolu [25].

### **Ekspresja genowa**

Wybierając gen kandydujący, umieszczony w określonej organizacji genomowej, poddaje się go systematycznym poszukiwaniom mutacji. Potwierdza się w ten sposób lokalizację chromosomalną. Umożliwia to fenotypowe badania asocjacyjne (u osobników niespokrewnionych i u rodzin) oraz badania funkcjonalne, jak również tak zwane wdrukowanie (*imprinting*).

Do niedawna analizy ekspresji genów związanych z alkoholem były ograniczone do badań nad zwierzętami w poszukiwaniu genów kandydujących. Jednocześnie oceniano pojedynczy gen i różnice w jego ekspresji. W ten sposób wykazano zwiększoną ekspresję genów receptorów NMDA, GABA receptorów glicynowych, receptorów związanych z białkiem G, transporterów neuroprzekaźników systemów drugiego przekaźnika i czynników transkrypcyjnych [26–29]. Obecnie możliwe jest stworzenie „chipów” do badań genowych, które przez komplementarne RNA zawierają tysiące genów. Na pojedynczej szklanej płytce poddane są działaniu „chipa”, a ich aktualną ekspresję mierzy się poprzez hybrydyzację. W ten sposób można badać grupy poddane działaniu alkoholu i kontrole, obserwując różną ekspresję genów.

Lewohl i wsp. badali ekspresję ponad 4000 genów i stwierdzili, że ekspresja w korze czołowej u 163 ludzi *post mortem* (uzależnieni od alkoholu vs. grupa kontrolna) różni się więcej niż w 40% pomiędzy osobami uzależnionymi i grupą kontrolną [30].

Thibault i wsp., porównując 6000 ludzkich genów linii komórkowych *neuroblastoma* przewlekłe eksponowanych na alkohol, stwierdzili, że 42 z nich miało zwiększoną lub obniżoną ekspresję w 3. dniu eksperymentu. Szczególnie interesującą obserwacją był

wzrost ekspresji genu hydroksylazy dopaminowej (DBH), któremu towarzyszył wzrost stężenia epinefryny w komórkach [31].

W swoich badaniach Xu i wsp., porównując całościową ekspresję profilu genów u zwierząt „krótko śpiących” do „długo śpiących” po narkozie etanolo-owej, wykazali, że 41 genów spośród badanych 6000 różniło się ekspresją [32].

Problem w tych badaniach stwarza interpretacja wyników, konieczny jest dalszy rozwój bioinformatyki [33].

### **Sekwencja genowa (poszukiwanie *quantitative trait loci*)**

Mapowanie genów jest trzecim rodzajem poszukiwania specyficznych genów związanych z zespołem zależności alkoholowej. Takie poszukiwania polegają na mapowaniu genów przez odnajdowanie polimorfizmów w konkretnym genie albo na odcinku chromosomu, który jest blisko sprzężony z danym genem. Kiedy taki polimorfizm (zmieniona sekwencja par zasad DNA) jest sprzężony, można go uznać za genetyczny marker i często wymyka się prawom Mendla (prawo segregacji i niezależnego rozdziału alleli).

Im bliższe sprzężenie, tym mniej prawdopodobne jest, że dany osobnik odziedziczy taki marker od jednego z rodziców, a mapowany gen od drugiego.

Odpowiedź na alkohol nie podlega zasadzie „wszystko albo nic”. W obserwacji populacji badanej większość osób wykazuje średnią odpowiedź, podczas gdy pojedyncze osobniki wykazują odpowiedź ekstremalnie wysoką lub niską. Świadczy to o tym, że odpowiedzi na alkohol są cechą ilościową, a nie jakościową, w której uczestniczy wiele genów.

W poszukiwaniu takich genów początkowo ustala się szeroką lokalizację chromosomalną, a potem stopniowo zawęża się ją do coraz mniejszych regionów otaczających gen. Dlatego też poszukiwanie genów odpowiedzi na alkohol jako genów oddziałujących na złożone cechy rozpoczyna się od identyfikacji tak zwanych QTL. Istnieje wiele technik mapowania QTL i są one conceptualnie podobne, jedne stosuje się na modelach ludzkich, inne na zwierzęcych. Wszystkie metody zależą od istnienia wielu genetycznych markerów rozproszonych w genomie. Użyteczność tych markerów (polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych [RFLP, *restricted fragment length polymorphism*], zmienna liczba powtórzeń tandemowych [VNTR, *variable number of tandem repeats*]) poznano już w późnych latach 80. XX wieku [34].

Obecnie, kiedy zakończono mapowanie ludzkiego genomu, liczba markerów do mapowania znacznie się zwiększyła. Ponieważ cały genom myszy był zmapo-

wany w 2002 roku, nowa generacja markerów (polimorfizm pojedynczych nukleotydów [SNP, *single nucleotide polymorphism*]) umożliwia szerszą eksplorację badawczą.

Do dzisiaj tylko dwa specyficzne geny mają potwierdzone właściwości protekcyjne. Są to warianty genów enzymów metabolicznych ALDH2\*2 i ADH2\*2. Posiadanie tych alleli prowadzi do kumulowania się aldehydu octowego, który wywołuje wiele nieprzyjemnych objawów ubocznych, które są odczuwane jako awersyjne. Dlatego też osoby z tymi allelami unikają nadmiernego picia alkoholu [11].

#### **QTL dla alkoholowego zespołu abstynencyjnego**

Celem każdego mapowania QTL jest postęp od *locus* do genu. Interesujące przykłady takiego postępu opisano dla QTL w zespole abstynencyjnym [35, 36].

Po podaniu etanolu 4 g/kg mc. mysz jest uśpiona przez 2–3 godziny. Po 3–24 h po iniekcji można obserwować ostry alkoholowy zespół abstynencyjny. Mysz wykazuje napady drgawkowe, których szczyt następuje 7 godzin po iniekcji [37]. Taką reakcję po raz pierwszy opisano we wczesnych latach 70. XX wieku, jako model objawu uzależnienia od alkoholu [38]. Reakcja staje się bardziej złożona, kiedy alkohol jest podawany przez długi czas. Goldstein wykazał, że ciężkość przebiegu alkoholowego zespołu abstynencyjnego podczas przyjmowania etanolu poprzez inhalację jest dziedziczna [39], co potwierdzili Crabbe i wsp. [40], a szczepy wyselekcjonowane myszy znacząco się różniły w ciężkości alkoholowego zespołu abstynencyjnego zarówno ostrego, jak i przewlekłego [41, 42]. Szczep myszy D2 miał najwyższe wyniki alkoholowego zespołu abstynencyjnego spośród wszystkich testowanych szczepów, podczas gdy szczep myszy B6 miał niskie wartości alkoholowego zespołu abstynencyjnego. Crabbe i wsp. testowali 400 myszy od szczepów F2 poprzez B6 i D2. Pozwoliło to na mapowanie trzech znamienych QTL związanych z ostrym alkoholowym zespołem abstynencyjnym na mysim chromosomie 1, 4, 11 [43]. QTL w tych samych regionach znaleziono dla ostrego zespołu odstawienia pentobarbitalu [44]. Crabbe odkrył region wielkości 35 cM (centymorganów) zawierający 600–700 genów. W szczepie myszy ISCS5 na chromosomie 4 odnaleziono obszar 1 cM, region zawiera 18 genów, który jest znamienne związany z alkoholowym zespołem abstynencyjnym (LOD = 8,8). Tylko w jednym z tych genów odnaleziono pewną liczbę polimorfizmów genu *Mpdz*. Uczestniczy on w powstawaniu białka kolokalizacji z podtypami receptorów serotoninowych, receptorem kinazy tyrozynowej i neuronalnego czynnika wzrostu NGF [43, 44].

#### **QTL dla fenotypów myszy w paradygmacie alkoholowej nagrody i awersji**

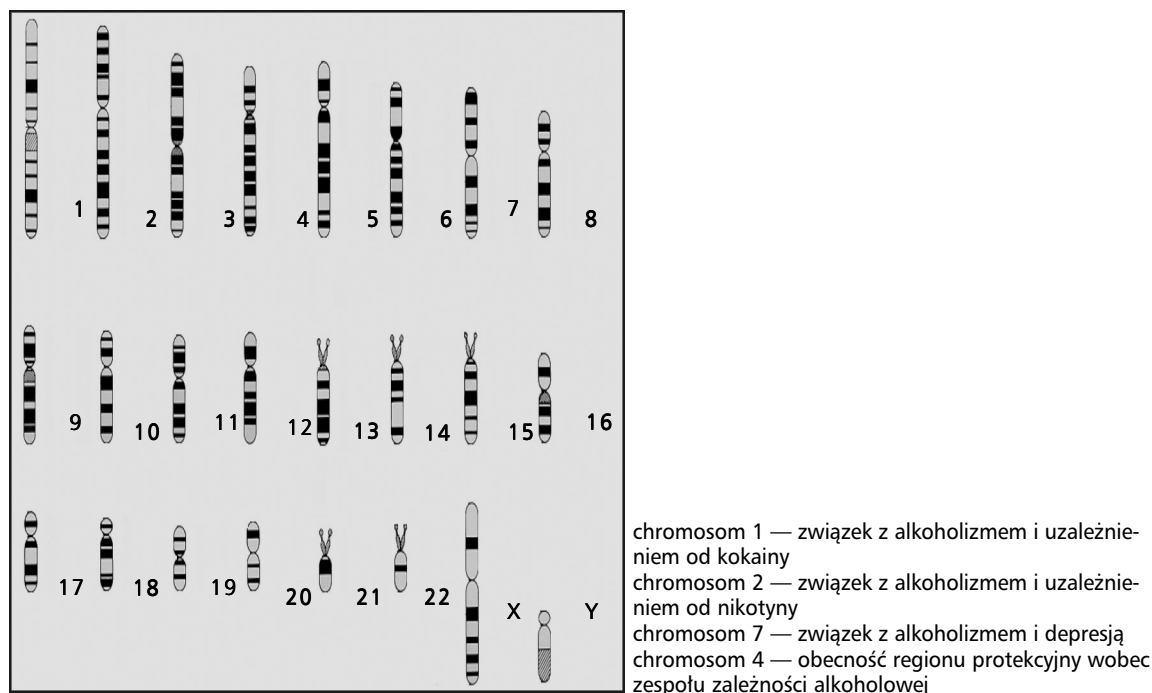
Phillips i wsp. w swoich badaniach obserwowali cechy uzależnienia fizycznego przy zastosowaniu 10-procentowego etanol vs. woda, „home-cage” w modelu genetycznym BXD RI, wytypowali regiony: Chr 2–49 cM, Chr 3–73 cM, Chr 4–59 cM, Chr 7–11 cM, Chr 7–57 cM, Chr 9–28 cM [45].

W analogicznych badaniach regiony wytypowane przez Rodriguez i wsp. to: Chr 1–33 cM, Chr 1–107 cM, Chr 2–53 cM, Chr 6–50 cM, Chr 7–13 cM, Chr 7–57 cM, Chr 10–67 cM, Chr 11–62 cM, Chr 12–53 cM, Chr 15–48 cM, Chr 17–4 cM [46].

Ponieważ myszy i ludzie mają wspólnego „ewolucyjnego” przodka, długie odcinki nici DNA pozostają w sprzężeniu. To znaczy, że poszukując QTL u myszy, można go znaleźć również na ludzkim genomie z prawdopodobieństwem większym niż 80%. Należy wspomnieć o opisanych QTL u myszy, związanych z tolerancją na alkohol i utratą koordynacji ruchu [11].

#### **Identyfikacja genów ludzkich**

W mapowaniu genów u ludzi wykorzystuje się warianty opisane u myszy. Jednak u ludzi proces ten jest znacznie trudniejszy. Jest on zdeterminowany sposobem łączenia się w pary i rozmnażania u ludzi, ludzką polimorficznością. Co więcej, ludzie różnych ras tworzą genetyczne subpopulacje z charakterystyczną dla siebie częstotliwością alleli. Porównywanie częstotliwości alleli genu pomiędzy grupą pacjentów określaną jako kontrola jest obarczone ryzykiem błędu efektu stratyfikacji, to znaczy, że kontrole, jak również grupy uzależnionych od alkoholu mogą się różnić w obrębie jednej subpopulacji. To powoduje, że związki z markerem nie dają się replikować na innych próbkach. Innym problemem jest fakt, że w badaniach wśród ludzi analizuje się związek markera z diagnozą. Diagnozę alkoholizmu można postawić na podstawie różnych zespołów objawów (clusterów). W związku z tym grupy uzależnionych od alkoholu w badaniach genetycznych są diagnostycznie i potencjalnie etiologicznie heterogenne. Konsekwentne poszukiwanie markerów związanych z alkoholizmem przypomina poszukiwanie innych cech złożonych. Istotne znaczenie mają badania *Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism* (COGA). Podstawą tych badań była współpraca w ocenie genotypów rodzin, u których stwierdzono zespół zależności alkoholowej co najmniej u 3 spokrewnionych osób. Zgromadzono informacje i genotypy ponad 11 000 osób, zanalizowano 1650 rodowodów [6, 47]. Najbardziej obiecujące w tych badaniach było skupienie się na tak zwanych endofenotypach.



**Rycina 3.** Ludzkie chromosomy, na których znaleziono odcinki DNA sprzężone z chorobami  
**Figure 3.** Human chromosomes, which were found to contain DNA segments linked to diseases

Endofenotyp opisuje się przez współwystępowanie wielu cech, to znaczy konieczna jest asocjacja markera z chorobą w badanej populacji, marker jest dziedziczny, a obecność markera jest niezależna od tego, czy dana osoba choruje, czy jeszcze pozostaje w zdrowiu (u niektórych osobników manifestuje się to czynną chorobą, u innych nie musi), w obrębie rodzin markerów może dochodzić do tak zwanej kosegregacji choroby [48].

Na przykład u osób uzależnionych od alkoholu i ich bliskich krewnych wykazano obecność niższych amplitud potencjałów wywołanych zwanych falami P3 lub P300 [49]. Wykazano również, że na chromosomie 11 u myszy istnieje region dla kilku podtypów receptora GABA-A odpowiedzialnego za powyższy efekt [50, 47]. W badaniach COGA określono miejsca na chromosomach, które są sprzężone z zespołem zależności alkoholowej, potwierdzone na dwóch niezależnych grupach rodzin z problemami alkoholowymi [51]. Określone zostały związki genów z patogenezą uzależnień (ryc. 3).

W badaniach genomu ludzkiego stwierdzono, że chromosom 1 w rejonie D1S1588 posiada *loci* dla genów: kanałów chlorkowych i potasowych, adenozylo 3':5' monofosfatazy, białka wiążącego gamma-5-guaninę, białka dla kinazy białkowej C typu 2 [51].

Wykryto na chromosomie 2 w rejonie markera D2S379 *loci* dla genów: kinazy białkowej epsilon, białka wiążącego acetylo-CoA [51].

Loci na chromosomie 4 są związane z działaniem protekcyjnym wobec uzależnienia alkoholowego w związku z obecnością genów dla dehydrogenaz alkoholowej i aldehydowej ALDH2\*2 i ADH2\*2 [11].

Podsumowując, można stwierdzić, że alkoholizm czy uzależnienie od kokainy wiąże się z chromosomem 1, chromosom 2 predysponuje do alkoholizmu i uzależnienia od nikotyny, chromosom 7 łączy się z alkoholizmem i depresją, a na chromosomie 4 jest obecny region wykazujący działanie ochraniające przed wystąpieniem zespołu zależności alkoholowej [47, 51].

### Podsumowanie

W badaniach genów odpowiedzialnych za reakcję na alkohol, trwających od około 10 lat, dokonał się znaczący postęp, ale nie ma genu, który byłby jednoznacznie odpowiedzialny za zespół zależności alkoholowej. Geny wchodzić ze sobą w interakcję (epistaza). Pojedyncze efekty genu nie są identyczne mimo identycznych genotypów, a jest to prawdopodobnie związane ze złożonym oddziaływaniem środowiska.

W Katedrze i Klinice Psychiatrii Pomorskiej Akademii Medycznej obserwowano, czy polimorfizmy genów są dziedziczone znamienne części w populacji rodzin z problemami alkoholowymi i poszukiwano relacji fenotypowo-genotypowej w celu wydzielenia bardziej homogennej grupy pacjentów, charakteryzujących się szczególną podatnością na uzależnienia.



**Streszczenie**

Rodzinne współwystępowanie zespołu zależności od alkoholu znano od dawna. Około 50–60% czynników zależy od komponenty genetycznej i jest niezależne od płci. Celem tego artykułu jest przegląd piśmiennictwa dotyczącego aktualnej wiedzy na temat genów kandydujących w zespole zależności alkoholowej. Istnieje kilka technik pozwalających na identyfikację tych genów. W badaniach na zwierzętach wykorzystano między innymi takie metody i techniki, jak: selekcjonowanie linii zwierząt preferujących alkohol, badanie zwierząt transgenicznych, metody behawioralne (samopodawanie, warunkowanie) oraz mapowania genomu w celu znalezienia tak zwanych miejsc ilościowych (QTL, quantitative trait loci), insercji bądź inaktywacji celowanych genów kandydujących oraz pomiarów zmian ekspresji genów. W pracy przedstawiono przykłady obliczeń statystycznych, różnice metodologii w badaniach modeli rodzinnych i badań asocjacyjnych osobników niespokrewnionych.

**słowa kluczowe:** badania molekularno-genetyczne, zespół zależności alkoholowej, alkoholowy zespół abstynencyjny, badania asocjacyjne, badania analizy sprzężeń, technologia knock-out, QTL, TDT

Otrzymane wyniki wskazują, iż zastosowanie strategii fenotypowo-genotypowej pozwoliło wyodrębnić warianty polimorfizmów genów związanych z potencjalnym zagrożeniem uzależnienia od etanolu. Nie znaleziono dotychczas markerów genetycznych wspólnych dla całej grupy uzależnionych od alkoholu [29]. Dla wybranych fenotypów pacjentów z zespołem zależności alkoholowej, to jest spełniających kryteria: *heavy drinkers*, obciążenie rodzinne alkoholizmem (przynajmniej jeden rodzic uzależniony), podwyższony poziom lęku, próby samobójcze, stwierdzono asocjacje z polimorfizmami genów DRD2 (Taq A, Egzon 8), MAO A 30 pz. VNTR w promotorze i DAT1 40 pz VNTR [52–54]. Statystycznie znamienna była preferencyjna transmisja allelu A10 polimorfizmu genu DAT1 i allelu A2 polimorfizmu genu DRD2 Taq A [9, 55].

Jak się okazuje, przyczynami braku powtarzalności wyników badań genetycznych jest heterogeniczność próbek, etniczne różnice między probandami, inaczej rozumiane kryteria diagnostyczne oraz przyczyny statystyczne, to jest zbyt mała liczebność próby i fałszywie dodatnie wyniki.

Na podstawie analizy dotychczasowych doświadczeń i wyników można określić zalecenia dotyczące dalszych badań. Istotna jest replikacja otrzymywanych pozytywnych wyników na innym reprezentatywnym materiale, ważna jest wielkość grupy badanej uwzględniająca liczenie siły statystycznej i etniczna homogenność grupy; pożądane są badania asocjacyjne oparte na modelu rodzinnym, jak również eksperymentalny dowód na znaczenie funkcjonalne asocjacji (np. na hodowlach tkankowych); konieczna jest również analiza haplotypów.

Odkrycia te mogą mieć istotne znaczenie dla psychiatrii w związku z możliwością poznania neurobiologicz-

nych podstaw zaburzeń psychicznych, zwiększeniem precyzyjności diagnostycznej oraz usunięciem stygmatyzatu, a ponadto opracowaniem strategii celowanego leczenia zarówno na podstawie danych farmakogenetycznych, jak i implikacji klinicznych [56].

**PIŚMIENNICTWO**

1. Merikangas K.R. The genetic epidemiology of alcoholism. *Psychol. Med.* 1990; 20: 11–22.
2. Samochowiec J. Molekularno-biologiczne mechanizmy zespołu zależności alkoholowej. Shaker Verl., Aachen 1999.
3. McGuffin P., Huckle P. Simulation of Mendelism revisited: the recessive gene for attending medical school. *Am. J. Hum. Genet.* 1990; 46: 994–999.
4. Goldman D., Brown G.L., Albaugh B. i wsp. DRD2 dopamine receptor genotype, linkage disequilibrium, and alcoholism in American Indians and other populations. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1993; 17: 199–204.
5. Samochowiec J., Kucharska-Mazur J., Pełka-Wysiecka J. i wsp. Association/Linkage Disequilibria Studies in Polish Families with Alcohol Dependence. Congress of the European Society for Biomedical Research Alcoholism, Praha 2003, Alcohol; suppl. 2003.
6. Samochowiec J. Genetyka uzależnienia od alkoholu i wzorców osobowości. W: Dziedzicka-Wasylewska M. (red.). Genetyka molekularna chorób układu nerwowego. XVIII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Mogilany 2001. Platan, Kraków 2001.
7. Enoch R. Genes and human behaviour. *Ann. Rev. Psychol.* 1995; 4: 625–654.
8. World Health Organization. International classification of diseases: Clinical descriptions and diagnostic guidelines, 10th rev. World Health Organization, Geneva 1992.
9. Samochowiec J., Kucharska-Mazur J., Pełka-Wysiecka J. i wsp. Wpływ badań genetycznych na poznanie patogenezy uzależnień. 41 Zjazd PTP, Warszawa 2004. Supl. Psychiatria Polska 2004.
10. Samochowiec J. Genetic polymorphisms associated with alcohol dependence syndrome. Aktuelle Aspekte und Perspektiven Psychiatrischer Forschung. Sommersemester 2004, Charité Campus Mitte. Berlin 2004.
11. Crabbe J.C. Current strategies for identifying genes for alcohol sensitivity. W: Maldonado R. (red.). Molecular biology of drug addiction. Humana Press, New Jersey 2003.
12. Boehm II S.L., Schafer G.L., Phillips T.J., Browman K.E., Crabbe J.C. Sensitivity to ethanol-induced motor incoordination in 5-HT<sub>2B</sub> receptor null mutant mice is task-dependent: implications for behavioral assessment of genetically altered mice. *Behav. Neurosci.* 2000; 114: 401–409.
13. Homanics G.E., Le N.Q., Kist F. i wsp. Ethanol tolerance and withdrawal responses in GABA<sub>A</sub> receptor alpha6 subunit null allele mice and in inbred C57BL/6J and strain 129/SvJ mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1998; 22: 259–265.

14. Coste S.C., Kesterson R.A., Heldwein K.A. i wsp. Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat. Genet.* 2000; 24: 403–409.
15. Bouwknecht J.A., Hijzen T.H., van der Gugten J. i wsp. Ethanol intake is not elevated in male 5-HT(1B) receptor knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 403: 95–98.
16. Crabbe J.C., Phillips T.J., Feller D.J. i wsp. Elevated alcohol consumption in null mutant mice lacking 5-HT1B serotonin receptors. *Nat. Genet.* 1996; 14: 98–101.
17. Sander T., Samochowiec J., Smolka M. i wsp. Evaluation of an allelic association of the serotonin 5-HT1B G681C polymorphism with antisocial alcoholism in the German population. *Addict. Biol.* 2000; 5, 2: 167–172.
18. Risinger F.O., Bormann N.M., Oakes R.A. Reduced sensitivity to ethanol reward, but not ethanol aversion in mice lacking 5-HT1b receptors. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1996; 20: 1401–1405.
19. Engel S.R., Lyons C.R., Allan A.M. 5-HT3 receptor over-expression decreases ethanol self administration in transgenic mice. *Psychopharmacology* 1998; 140: 243–248.
20. Popova N.K., Vishnivetskaya G.B., Ivanova E.A., Skriskaya J.A., Seif I. Altered behavior and alcohol tolerance in transgenic mice lacking MAO A: a comparison with effects of MAO A inhibitor clorgyline. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2000; 67: 719–727.
21. Cunningham C.L., Howard M.A., Gili S.J. i wsp. Ethanol-conditioned place preference is reduced in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2000; 67: 693–699.
22. El-Ghundi M., George S.R., Drago J. i wsp. Disruption of dopamine D1 receptor gene expression attenuates alcohol-seeking behavior. *Eur. J. Pharmacol.* 1998; 353: 149–158.
23. Phillips T.J., Belknap J.K., Buck K.J., Cunningham C.L. Genes on mouse chromosomes 2 and 9 determine variation in ethanol consumption. *Mammal. Genome* 1998; 9: 936–941.
24. Risinger F.O., Freeman P.A., Greengard P., Fienberg A.A. Motivational effects of ethanol in DARPP-32 knock-out mice. *J. Neurosci.* 2001; 21: 340–348.
25. Weinshenker D., Rust N.C., Miller N.S., Palmiter R.D. Ethanol-associated behaviors of mice lacking norepinephrine. *J. Neurosci.* 2000; 20: 3157–3164.
26. Cunningham C.L., Phillips T.J. Genetic basis of alcohol reward. W: Maldonado R. (red.). *Molecular Biology of Drug Addiction*. Humana Press, New Jersey 2003.
27. Crabbe J.C. Where does alcohol act in the brain? *Mol. Psychiatr.* 1997; 2: 17–20.
28. Reilly M.T., Fehr C., Buck K.J. Alcohol and gene expression in the central nervous system. W: Moussa-Moustaid N. (red.). *Nutrient-Gene Interactions in Health and Disease*. CRC Press, Boca Raton 2001.
29. Wernicke C., Samochowiec J., Schmidt L.G. i wsp. Polymorphism in the N-Methyl-D-Aspartate receptor 1 and 2B Subunits Are Associated with Alcoholism-Related Traits. *Biol. Psychiatry* 2003; 54: 922–928.
30. Lewohl, J.M., Wang, L., Miles, M.F. i wsp. Gene expression in human alcoholism: microarray analysis of frontal cortex. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2000; 24: 1873–1882.
31. Thibault C., Lai C., Wilke N. i wsp. Expression profiling of neural cells reveals specific patterns of ethanol-responsive gene expression. *Mol. Pharmacol.* 2000; 58: 1593–1600.
32. Xu Y., Ehringer M., Yang F., Sikela J.M. Comparison of global brain gene expression profiles between inbred long-sleep and inbred short-sleep mice by high-density gene array hybridization. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2001; 25: 810–818.
33. Lockhart D.J., Winzler E.A. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 2000; 405: 827–836.
34. Lander E.S., Botstein D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 1989; 121: 185–199.
35. Buck K.J., Metten P., Belknap J.K., Crabbe J.C. Quantitative trait loci involved in genetic predisposition to acute alcohol withdrawal in mice. *J. Neurosci.* 1997; 17: 3946–3955.
36. Buck K., Metten P., Belknap J., Crabbe J.C. Quantitative trait loci affecting risk for pentobarbital withdrawal map near alcohol withdrawal loci on mouse chromosomes 1, 4, and 11. *Mamm. Genome* 1999; 10: 431–437.
37. Crabbe J.C., Merrill C.D., Belknap J. K. Acute dependence on depressant drugs is determined by common genes in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991; 257: 663–667.
38. Goldstein D.B., Pal N. Alcohol dependence produced in mice by inhalation of ethanol: grading the withdrawal reaction. *Science* 1971; 172: 288–290.
39. Goldstein D.B. Inherited differences in intensity of alcohol withdrawal reactions in mice. *Nature* 1973; 245: 154–156.
40. Crabbe J.C., Kosobud A., Young E.R. i wsp. Bidirectional selection for susceptibility to ethanol withdrawal seizures in *Mus musculus*. *Behav. Genet.* 1985; 15: 521–536.
41. Metten P., Crabbe J.C. Common genetic determinants of severity of acute withdrawal from ethanol, pentobarbital and diazepam in inbred mice. *Behav. Pharmacol.* 1994; 5: 533–547.
42. Crabbe J.C. Jr, Young E.R., Kosobud A. Genetic correlations with ethanol withdrawal severity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1983; suppl. 18: 541–547.
43. Crabbe J.C. Provisional mapping of quantitative trait loci for chronic ethanol withdrawal severity in BXD recombinant inbred mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; 286: 263–271.
44. Fehr C.E., Shirley R.L., Belknap J.K., Crabbe J.C., Buck K.J. Congenic mapping of alcohol and pentobarbital withdrawal liability loci to a < 1 centimorgan interval of murine chromosome 4: identification of *Mpdz* as a candidate gene. *J. Neurosci.* 2002; 22: 3730–3738.
45. Phillips T.J., Crabbe J.C., Metten P., Belknap J.K. Localization of genes affecting alcohol drinking in mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1994; 18: 931–941.
46. Rodriguez L.A., Plomin R., Blizard D.A. i wsp. Alcohol acceptance, preference, and sensitivity in mice. II. Quantitative trait loci mapping analysis using BXD recombinant inbred strains. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1995; 19: 367–373.
47. Begleiter H., Reich T., Nurnberger J. Jr. i wsp. Description of the Genetic Analysis Workshop 11 Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism. *Genet. Epidemiol.* 1999; 17 (supl. 1): 25–30.
48. Lenox R.H., Gould T.D., Manji H.K. Endophenotypes in bipolar disorders. *Am. J. Med. Gen.* 2002; 114: 391–406.
49. Begleiter H., Porjesz B. What is inherited in the predisposition toward alcoholism? A proposed model. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1999; 23: 1125–1135.
50. Samochowiec J., Kucharska-Mazur J., Samochowiec A. i wsp. Association/Linkage Disequilibria Studies in Polish Families with Alcohol Dependence. International Congress of Biological Psychiatry, Sydney 2004. *World Journal of Biological Psychiatry*, Supl. 2004.
51. Foroud T., Edenberg H.J., Goate A., Begleiter H. i wsp. Alcoholism susceptibility loci: confirmation studies in a replicate sample and further mapping. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2000; 7: 933–945.
52. Samochowiec J., Kucharska-Mazur J., Schmidt L.G. i wsp. Norepinephrine transporter gene polymorphism is not associated with susceptibility to alcohol dependence. *Psychiatry Res.* 2002; 111: 229–233.
53. Samochowiec J., Kucharska-Mazur J., Rybakowski F. i wsp. Norepinephrine transporter polymorphism and personality trait of reward dependence in male alcoholics. *Pharmacopsychiatry* 2002; 35: 195–196.
54. Schmidt L.G., Samochowiec J., Finckh U. i wsp. Association of a CB1 cannabinoid receptor gene (CNR1) polymorphism with severe alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend.* 2002; 65: 221–224.
55. Pełka-Wysiecka J., Samochowiec J., Syrek S. i wsp. Zależność cech psychobiologicznych i badanych polimorfizmów genów DRD2, DAT1, 5HTT, MAO A i COMT w populacji osób obciążonych uzależnieniem od alkoholu. *Post. Psychiatr. Neurol.* 2004; 13 (Supl. 3): 35–46.
56. Samochowiec J., Samochowiec A., Wojciechowski B. Nowoczesna terapia zespołu zależności alkoholowej: doświadczenia europejskie. *Polska Medycyna Rodzinna* 2004; 6: 3.